

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620111152357

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

MHB 相关基因在文昌鱼胚胎发育中的表达
谱及功能分析

Expression patterns and functional analysis of MHB
related genes in amphioxus

李 清

指导教师姓名: 王 义 权 教 授

专 业 名 称: 遗 传 学

论文提交日期: 2014 年 4 月

论文答辩日期: 2014 年 5 月

学位授予日期: 2014 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 5

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

目 录

摘 要.....	1
Abstract.....	3
第一章 文献综述.....	5
一 文昌鱼——进化发育生物学中的新型模式生物.....	5
1 文昌鱼的系统学地位与研究意义.....	5
2 文昌鱼的早期胚胎发育.....	6
3 文昌鱼发育分子生物学研究.....	6
二 中枢神经系统的进化.....	8
1 无脊椎动物神经系统的进化.....	8
2 脊椎动物中枢神经系统的形成.....	9
3 文昌鱼神经系统研究进展.....	10
三 MHB 的研究进展.....	12
1 MHB-控制中脑和后脑发育的关键区域.....	12
2 MHB 的进化.....	14
四 论文的选题和目的.....	17
第二章 MHB 相关基因在文昌鱼胚胎发育中的表达谱分析.....	18
一 材料与方法.....	18
1 材料与试剂.....	18
2 方法.....	19
二 结果.....	22
1 <i>Otx</i> 的空间表达谱.....	22
2 <i>Gbx</i> 的空间表达谱.....	23
3 <i>En</i> 的空间表达谱.....	25
4 <i>Hox1</i> 、 <i>Hox3</i> 的空间表达谱.....	26
5 <i>FGF8/17/18</i> 的空间表达谱.....	28
6 <i>Wnt1</i> 、 <i>Wnt3</i> 、 <i>Wnt5</i> 、 <i>Wnt7</i> 、 <i>Wnt8</i> 的空间表达谱.....	29

三 讨论	32
1 神经外胚层前部 <i>Otx</i> 和后部 <i>Gbx</i> 的表达模式进化上是保守的 ...	32
2 MHB 相关基因表达谱的比较	33
第三章 <i>Otx</i> 和 <i>Gbx</i> 基因在文昌鱼胚胎发育中的功能	35
一 材料、试剂与方法	35
1 材料、试剂与仪器	35
2 方法	36
二 结果	39
1 siRNAs 敲低 <i>Otx</i> 基因的表达	39
2 <i>Otx</i> 基因过表达研究	43
3 siRNAs 敲低 <i>Gbx</i> 基因的表达	47
4 <i>Gbx</i> 基因过表达研究	51
三 讨论	55
1 敲低 <i>Otx</i> 和 <i>Gbx</i> 基因后未见明显表型变化的原因分析	55
2 过表达 <i>Otx</i> 和 <i>Gbx</i> 基因均能引起文昌鱼胚胎前端发育缺陷	55
3 <i>Otx</i> 、 <i>Gbx</i> 基因可以调控 MHB 相关基因的表达	56
参考文献	58
总结与展望	70
附录 I 方法	72
附录 II 白氏文昌鱼若干发育相关基因的表达谱	85
致谢	95

Contents

Abstract in Chinese	1
Abstract in English.....	3
Chapter 1 Introduction	5
1 The new model organism of evolutionary development	
biology:Amphioxus	5
1 Phylogenetic position of amphioxus and research significance	5
2 Early embryogenesis of amphioxus	6
3 Amphioxus and molecular development biology	6
2 The evolution of the central nervous system	8
1 The evolution of the invertebrate nervous system	8
2 The formation of the vertebrate central nervous system.....	9
3 Research progress of amphioxus nervous system.....	10
3 Progress in the study of MHB.....	12
1 MHB-the key area of controlling the development of midbrain and	
hindbrain	12
2 The evolution of the midbrain/hindbrain boundary	14
4 Goal of our research.....	17
Chapter 2 Expression patterns analysis of MHB related	
genes in amphioxus.....	18
1 Materials and methods	18
1 Materials and reagents	18
2 Methods.....	19
2 Results	22
1 Spatial expression pattern of <i>Otx</i> gene.....	22
2 Spatial expression pattern of <i>Gbx</i> gene.....	23
3 Spatial expression pattern of <i>En</i> gene	25
4 Spatial expression patterns of <i>Hox1</i> and <i>Hox3</i> genes	26
5 Spatial expression pattern of <i>FGF8/17/18</i> gene	28
6 Spatial expression patterns of <i>Wnts</i> genes	29
3 Discussion.....	32

1 Division of neurogenic ectoderm into anterior <i>Otx</i> and posterior <i>Gbx</i> domain is evolutionarily conserved	32
2 Comparative analysis of MHB related genes expression patterns	33
Chapter 3 Functional analysis of <i>Otx</i> and <i>Gbx</i> genes during embryonic development	35
1 Materials, reagents and methods	35
1 Materials, reagents and instruments	35
2 Methods	36
2 Results	39
1 siRNAs can knockdown <i>Otx</i> expression	39
2 The research of <i>Otx</i> overexpression	43
3 siRNAs can knockdown <i>Gbx</i> expression	47
4 The research of <i>Otx</i> overexpression	51
3 Discussion	55
1 The reasons for not observing significant phenotypic changes after <i>Otx</i> and <i>Gbx</i> knockdown	54
2 The front embryonic defects caused by <i>Otx</i> and <i>Gbx</i> overexpression	55
3 <i>Otx</i> and <i>Gbx</i> can regulate MHB related genes expression	56
Reference	58
Summary and prospects	70
Appendix I Methods	72
Appendix II The expression patterns of several developmental genes in <i>B.belcheri</i>	85
Acknowledgements	95

MHB 相关基因在文昌鱼胚胎发育中的表达谱及功能分析

摘 要

中后脑边界 (midbrain-hindbrain boundary, MHB) 是控制中脑和后脑发育的关键区域, 它的位置最初是由 *Otx2* 和 *Gbx2* 在中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 中的表达界线所决定。MHB 建立后, 一系列对 MHB 发育重要的信号分子 (如 *Wnt1*、*Fgf8*) 和转录因子 (如 *Pax2,5,8*、*Engrailed*) 开始在这个区域表达。尽管先前人们对 MHB 相关基因在胚胎发育中的功能已有很多广泛深入的研究报道, 但这些数据主要来自果蝇、爪蟾、斑马鱼和小鼠等类群中, 在其它类群中研究相对较少。文昌鱼是介于无脊椎动物和脊椎动物之间的过渡类型, 是研究动物进化和胚胎发育的典型材料, 利用分子生物学手段, 研究文昌鱼 MHB 发育相关基因的表达和功能, 有助于我们从分子水平上了解 MHB 的起源和进化, 并且为揭示文昌鱼神经系统发育和分化机制提供基础数据。

本文首先克隆了白氏文昌鱼 *Otx*、*Gbx*、*En*、*Hox1*、*Hox3*、*FGF8/17/18*、*Wnts* 等基因, 通过空间表达谱研究, 我们发现: 1) 神经外胚层前部 *Otx* 和后部 *Gbx* 的表达模式进化上是保守的。2) 这些基因在白氏文昌鱼和佛罗里达文昌鱼早期胚胎发育中的表达谱是基本一致的。3) 白氏文昌鱼 *Otx* 和 *Gbx* 在神经管的表达区域之间有一个明显界线, 这部分区域极可能与脊椎动物 MHB 区域同源。虽然 *Otx* 和 *Gbx* 基因的表达图式显示它们之间也许相互抑制, 但是行使组织者功能的其它 MHB 标记基因 (如 *Wnt1*、*En*) 并没有在这个区域表达。

为了进一步探究 *Otx* 和 *Gbx* 基因在文昌鱼胚胎发育中的功能, 我们针对 *Otx* 和 *Gbx* 分别设计了 2 条和 3 条 siRNA, 并构建了体外表达载体, 合成相应的 mRNA, 研究敲低和过表达 *Otx* 和 *Gbx* 对胚胎产生的影响。用 RT-qPCR 和原位杂交对注射 *Otx*-siRNA1 和 *Gbx*-siRNA3 的实验组与注射 Control siRNA 的对照组胚胎进行检测, 结果显示 siRNAs 确实能起到很好地敲低基因表达的效果。通过对胚胎正常发育率的统计和表型的观察, 发现虽然实验组胚胎的正常发育率有一定程度下降, 但与对照组胚胎相比没有发现明显表型差别, 猜想可能是由于微小

的改变不易察觉或者是基因的下调量未达到阈值不足以引起胚胎产生明显表型变化。通过 *Otx* 和 *Gbx* 的过表达研究, 结果显示注射较高浓度 *Otx*-mRNA 和 *Gbx*-mRNA 的实验组胚胎发育至 3 天幼体时胚胎前端均有明显的缺陷, 表明在文昌鱼神经系统发育中这两个基因都发挥着重要作用。另外, 我们用各种注射后的胚胎对 MHB 相关基因的表达量和表达位置进行检测, 发现: 敲低 *Otx* 和 *Gbx* 后, *FGF8/17/18* 的表达量有明显的上(下)调; 敲低 *Otx* 后, *Gbx* 基因在神经管表达的前边界略微前移; 敲低 *Gbx* 后, *Otx* 基因在神经管的表达区域变大且后边界略微后移; *Otx* 过表达后, *Gbx*、*Hox1* 和 *Pax2/5/8* 基因的表达量上调; *Gbx* 过表达后, *Otx* 基因在神经管表达的前边界明显前移, *Hox1* 基因的表达微量上调, 因此本研究结果表明文昌鱼 *Otx* 与 *Gbx* 基因也可以调控 MHB 相关基因的表达。

关键词: 文昌鱼; *Otx* 基因; *Gbx* 基因; MHB; 基因表达

Expression patterns and functional analysis of MHB related genes in amphioxus

Abstract

In the vertebrate central nervous system (CNS), mutual antagonism between posteriorly expressed *Gbx2* and anteriorly expressed *Otx2* positions the midbrain-hindbrain boundary (MHB), and then a series of signal molecules (such as *Wnt1* and *Fgf8*) and transcription factors (such as *Pax2*, 5, 8 and *Engrailed*) are expressed in this area. Although MHB related genes have been well studied in the *Drosophila*, zebrafish, *Xenopus* and mouse species concerning its involvement in early embryonic development, it remains poorly characterized in other lineages. The cephalochordate amphioxus is the closest living relative to the vertebrate, and has been widely known as the most important animal to study the origin and evolution of vertebrates. Studies on gene expression patterns and function in amphioxus will contribute to understand the origin and evolution of the MHB, and further illuminate the molecular mechanism of the development of amphioxus nervous system.

In this research, we cloned amphioxus *Otx*, *Gbx*, *En*, *Hox1*, *Hox3*, *FGF8/17/18* and *Wnts*, and analyzed their expression patterns. The expression patterns of these genes revealed several results. Firstly, division of neurogenic ectoderm into anterior *Otx* and posterior *Gbx* domains was evolutionarily conserved. Secondly, these genes early expression patterns were basically the same between *Branchiostoma belcheri* and *B. floridae*. Thirdly, there was a apparent boundary between the expression of *Otx* and *Gbx* in the neural tube and this area was most likely the homologous of vertebrate MHB. Although expression patterns of *Otx* and *Gbx* suggested that they may be mutual inhibition, MHB markers such as *Wnt1* and *En* were not expressed at high levels in this area.

To further demonstrate the role of *Otx* and *Gbx* during embryogenesis, we designed two siRNAs to knockdown *Otx* expression, three siRNAs to knockdown

Gbx expression and constructed overexpression vectors to study their function. RT-qPCR and ISH between the experimental group and the control group which were injected with *Otx*-siRNA1, *Gbx*-siRNA3 and Control siRNA respectively showed that siRNAs could knockdown *Otx* and *Gbx* expression remarkably. Through the normal developmental ratio analysis and phenotypic observation, we found that the normal developmental ratio of experimental group had some decline, but there was no significant difference between the two groups, supposing that small difference be not easy to tell or the amount of knockdown effect can't cause phenotypic difference. Through the phenotypic observation, we found high concentration of *Otx*-mRNA and *Gbx*-mRNA injection could lead to obvious defects in the experimental embryonic front when embryos developed to 3-day larva, which indicated that the two genes play an important role in the development of amphioxus nervous system. In addition, we detect the MHB related genes expression in embryos after injection, found that, the expression level of *FGF8/17/18* was obvious up (down) regulated, *Gbx* expression region in neural tube slightly forward former when *Otx* was knockdown, and *Otx* expression area was slightly larger and border backwards in neural tube when *Gbx* was knockdown. After *Otx* overexpression, *Gbx*, *Hox1* and *Pax2/5/8* were up-regulated. After *Gbx* overexpression, *Otx* expression region in neural tube moved forward obviously, *Hox1* gene expression slight up. So we inferred *Otx* and *Gbx* can regulate MHB related genes expression.

Key words: amphioxus, *Otx*, *Gbx*, MHB, gene expression patterns

第一章 文献综述

一 文昌鱼——进化发育生物学中的新型模式生物

1 文昌鱼的系统学地位与研究意义

白氏文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*) 隶属脊索动物门 (Chordata) 头索动物亚门 (Cephalochordata) 文昌鱼科 (Branchiostomidae), 因脊索延伸到神经管的前面, 故称为头索动物, 且因没有真正的头和脑, 故又有无头类 (Acrania) 之称。它一直在脊椎动物如何由无脊椎动物进化而来这一著名的生物学难题中占据重要的位置, 代表着高等动物进化过程中一个重要的过渡阶段^[1], 是研究动物进化和胚胎发育的理想材料。

文昌鱼的成体结构与脊椎动物有相似之处, 有背部中空的神经管和脊索、腹侧的肠管、有鳃裂的咽、轴向分段的肌节和性腺、肛后尾、前肾、内柱和口前窝^[2]。但是文昌鱼缺少一些脊椎动物特有的结构, 包括神经嵴细胞、神经基板、紧密的形态上分节的脑、成对的感觉器官和内骨骼等^[3]。在生物化学上, 文昌鱼有脊椎动物中具有磷酸肌酸等物质, 但却没有脊椎动物中具有血红蛋白和含铁的化合物。在生殖内分泌方面, 国内外学者先后发现文昌鱼哈氏窝能够合成脊椎动物促性腺激素样物质, 体内存在促性腺激素释放激素与性腺周期呈现正的相关性, 而且其性腺中还存在着性类固醇激素。表明文昌鱼存在原始的生殖内分泌调控轴, 即脑泡-哈氏窝-性腺轴^[4]。在基因和基因组方面, 文昌鱼处在两轮基因组 (2R) 倍增事件发生之前^[5,6], 基因组大小只相当于人的 17%^[7,8], 但几乎所有脊椎动物基因家族的成员都能在文昌鱼基因组中找到具有代表性的同源基因^[9]。通过研究文昌鱼的胚胎发育以及与此相关基因的表达调控, 有助于了解脊椎动物的起源和基因功能的演化。文昌鱼不仅是研究脊椎动物起源与器官功能演化的关键类群, 而且在进化发育生物学、比较基因组及功能基因组学研究等方面都具有重要意义^[9-13]。

作为一种新兴的模式生物, 文昌鱼主要有以下几点优势^[14]: 1、雌雄异体, 繁殖能力强; 2、整个胚胎与成体生长发育过程中通体透明; 3、基因组简单; 4、发育事件及胚胎结构简单原始; 5、发育周期短。6、个体小, 养殖花费少, 能大规模繁育, 适于在实验室中培养。

2 文昌鱼的早期胚胎发育

文昌鱼的胚胎发育过程在 1867 年由俄罗斯博物学家 Kowalevsky 首次报道, 他将文昌鱼的胚胎发育分为两个阶段, 早期的发育与无脊椎后口动物相似(如与海胆一样由中空的囊胚内陷形成原肠胚), 晚期的发育与脊椎动物相似(脊索形成, 背部中空的神经管, 分节的体节等)^[9]。童第周先生等^[15, 16]进行的一系列研究工作, 又使我们对文昌鱼胚胎发育的规律有了进一步的认识。

文昌鱼的胚胎发育分为受精卵、桑椹胚、囊胚、原肠胚、神经胚、幼体到成体 7 个时期。受精卵经过 8 次卵裂后形成囊胚, 囊胚经过原肠作用, 整个植物极半球内陷, 内陷的细胞层逐渐排挤囊胚腔而与动物极半球细胞层靠近, 结果形成双层壁的杯状结构, 外面的一层为外胚层, 将分化为表皮和神经系统, 里面的一层为中内胚层, 以后分化为肌节、脊索和消化肠道等, 它们所围的腔就是原肠腔, 与外界相通的孔为胚孔^[17]。经过神经胚的作用, 胚胎在原肠胚的背部形成神经管, 不闭合, 与胚孔相通, 称为神经肠管。在原肠胚背部的中央形成脊索。在神经胚晚期, 前端的内柱、原肾和腺(性)垂体等器官原基, 两侧腹部中胚层以及心脏管道和神经肠管等开始形成, 且胚孔周围的组织形成尾芽, 进而产生末端的脊索和体节。随着发育的进行, 胚胎逐渐变长, 伴随着在身体右侧第一个鳃裂的形成, 文昌鱼的发育进入幼体期。

3 文昌鱼发育分子生物学研究

发育的分子基础是基因的特异表达, 是基因按照特定的时间和空间表达的结果。通过分子生物学手段可以了解控制发育的遗传基础, 利用发育相关基因在进化中的保守性, 对不同物种之间进行比较有可能弄清这些基因是如何引起不同物种之间形态变化的。与脊椎动物相比, 文昌鱼的形态更为原始, 研究其发育基因的表达图式不仅有助于揭示文昌鱼发育的机制, 而且对揭示脊椎动物发育与进化、阐明生命本质也具有重要的意义。

3.1 脊椎动物神经板和神经嵴起源相关同源基因在文昌鱼中的表达

在脊椎动物早期原肠胚中, 可以根据众多外胚层分子标记如 *Noggin*、*Chordin*、*Follistatin* 和 *BMP4* 等将外胚层分为神经外胚层和表皮外胚层。已知文昌鱼的 *BMP2/4* 基因最初在整个外胚层表达, 很快在神经板细胞中表达减弱^[18]。因为 *BMP2/4* 基因在果蝇、文昌鱼和脊椎动物中的表达是非常保守的, 所以

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库